Aus dem Institut für Toxikologie und Pharmakologie
der Philipps-Universität in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Koransky

ÜBER DAS VERHALTEN VON PENTACHLORPHENOL IM WARMBLÜTER-ORGANISMUS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

MARIA-ELISABETH STRAUB
aus Schleching

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546010_0044

Aus dem Institut für Toxikologie und Pharmakologie
der Philipps-Universität in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Koransky

ÜBER DAS VERHALTEN VON PENTACHLORPHENOL IM WARMBLÜTER-ORGANISMUS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

MARIA-ELISABETH STRAUB

aus Schleching

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 15. 12. 1978

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin

Dekan:	Prof. Dr. med. F. Neurath
Referent:	Prof. Dr. med. W. Koransky
Correferent:	Prof. Dr. med. D. Schachtschabel

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	ZUSAMMENFASSUNG	1
2.	EINLEITUNG	3
3.	VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	4
4.	MATERIAL UND METHODEN	5
4.1.	Substanzen	5
4.1.1.	Pentachlorphenol	5
4.1.2.	Uniform markiertes ^{14}C-Pentachlorphenol	5
4.1.3.	Referenzsubstanzen	6
4.2.	Versuchstiere und Tierhaltung	6
4.3.	Applikation von Pentachlorphenol	7
4.4.	Messung der Radioaktivität in Gewebe, Urin, Kot und Ausatmungsluft	7
4.5.	Analyse der Proben	8
4.6.	Identifizierung der Substanzen	11
4.7.	Zellfraktionierung	11
4.8.	Bestimmung der Gesamtporphyrine, der delta-Aminolävulinsäure und von Porphobilinogen im Rattenurin und der Gesamtporphyrine in der Leber	12
4.8.1.	Bestimmung der Gesamtporphyrine	12
4.8.2.	Bestimmung der delta-Aminolävulinsäure	13
4.8.3.	Bestimmung von Porphobilinogen	
5.	ERGEBNISSE	14
5.1.	Untersuchungen zur Pharmakokinetik der applizierten Radioaktivität	14
5.1.1.	Resorption von Radioaktivität nach einmaliger enteraler bzw. parenteraler Gabe von ^{14}C-Pentachlorphenol	14
5.1.2.	Versuch einer Bilanzierung der applizierten Radioaktivität	14
5.1.3.	Verteilung und Elimination der Radioaktivität in den Geweben	15
5.1.4.	Ausscheidung von Radioaktivität in Kot und im Urin	18
5.2.	Isolierung, Identifizierung und Messung der in Kot, Urin und Gewebe enthaltenen chlorierten Verbindungen	18
5.2.1.	Identifizierung der ausgeschiedenen Substanzen	18

5.2.2. Messung der Radioaktivität und der Chlorverbindungen im Lebergewebe 23
5.2.3. Messung von Pentachlorphenol und Tetrachlorhydrochinon in Kot und Urin 25
5.3. Das Verhalten von Pentachlorphenol bei subchronischer Applikation 26
5.3.1. Konzentration von Pentachlorphenol und Tetrachlorhydrochinon in den Geweben 26
5.3.2. Gehalt an Porphyrinvorstufen und an Gesamtporphyrinen im Urin und in der Leber 29
6. DISKUSSION 32
7. LITERATURVERZEICHNIS 36

1. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Beurteilung des Verhaltens von Pentachlorphenol im Versuchstier wurde seine Pharmakokinetik untersucht. Darüberhinaus wurde sein Einfluß auf den Porphyrinstoffwechsel überprüft.

Nach einmaliger Gabe von markiertem Pentachlorphenol an weibliche Ratten konnte in allen untersuchten Organen der Tiere Radioaktivität nachgewiesen werden. Am höchsten waren die ^{14}C-Konzentrationen in der Leber, in der Niere und im Blut, am niedrigsten im Fettgewebe, im Muskel und im Gehirn. Das Muster der ^{14}C-Verteilung blieb innerhalb des Versuchszeitraumes annähernd gleich.

Die im Lebergewebe nachgewiesene Radioaktivität verteilte sich intracellulär zu annähernd gleichen Teilen auf die Fraktionen der Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und des Cytoplasmas. Nur ein Teil der in der Leber festgestellten Radioaktivität war mit Äther extrahierbar. Von der extrahierten Radioaktivität waren 4o - 8o % im Pentachlorphenol und im Tetrachlorhydrochinon enthalten. Der verbleibende Anteil der insgesamt im Lebergewebe erfaßten Radioaktivität konnte allerdings nicht identifiziert werden.

Die Elimination der Radioaktivität aus den Geweben erfolgte relativ rasch. Bis zur 48-igsten Stunde nach Applikation sank der Gehalt an Radioaktivität in den Geweben auf rund 18 Prozent und bis zur 144-igsten Stunde auf rund 5 Prozent seiner Maximalwerte.

Die markierten Substanzen wurden über Kot und Urin eliminiert. Innerhalb von 6 Tagen wurden über beide Eliminationswege ca. 9o % der verabfolgten Radioaktivität ausgeschieden. Davon fanden sich 6o % im Urin und 3o % im Kot.

Die im Urin nachgewiesene ^{14}C-Aktivität war zu annähernd gleichen Teilen in Pentachlorphenol und Tetrachlorhydrochinon enthalten. Die im Kot festgestellte Radioaktivität wurde durch Pentachlorphenol repräsentiert. In der Ausatmungsluft fand sich keine meßbare Radioaktivität.

Nach subchronischer Applikation von Pentachlorphenol wurde etwa 2 Wochen nach Versuchsbeginn ein annähernd konstant bleibender Gehalt an extrahierbarem Pentachlorphenol und Tetrachlorhydrochinon in den untersuchten Geweben beobachtet. Er belief sich bei täglicher Gabe von 15 mg/kg Pentachlorphenol in Blut, Leber und Niere auf 2o - 25 ppm Pentachlorphenol und 1 - 4 ppm Tetrachlorhydrochinon.

Während der fünfwöchigen Versuchsdauer unterschieden sich die behandelten Ratten in Aussehen und Verhalten nicht von den Kontrolltieren. Die Zunahme des Körpergewichts der behandelten Tiere erfolgte in gleichem Maße wie bei den unbehandelten Tieren. Der Urin der Tiere wurde auf seinen Gehalt an delta-Aminolävulinsäure, Porphobilinogen und Gesamtporphyrinen untersucht. Dabei wurde kein Unterschied im Gehalt an Porphyrin-Vorstufen und Gesamtporphyrinen im Vergleich zum Urin unbehandelter Tiere festgestellt.
Ebensowenig ergab sich ein Einfluß der Pentachlorphenol-Behandlung auf den relativen Gehalt der im Urin enthaltenen Porphyrine mit 8 und weniger Carboxylgruppen.

2. EINLEITUNG

Bei der Hexachlorbenzol-Vergiftung kommt es zu einer vermehrten Bildung von Uroporphyrinogen und Heptacarboxyporphyrinogen. Gleichzeitig nimmt die Menge an Porphyrinogenen mit geringerer Anzahl an Carboxyl-Gruppen ab. Man führte dieses auf eine Abnahme der Decarboxylase-Aktivität zurück (siehe zusammenfassende Darstellung von Tschudy und Bonkowsky, 1972). Da Hexachlorbenzol selbst offensichtlich keinen direkten Einfluß auf dieses Enzym ausübt (Elder et al., 1976), wird vermutet, daß ein Intermediärprodukt aus dem Hexachlorbenzol-Stoffwechsel oder ein Metabolit dieser Verbindung die Aktivität der Decarboxylase hemmt (Doss et al., 1976). In diesem Zusammenhang waren die Untersuchungen von Koss und Mitarbeiter (1976, 1978) interessant, wonach Hexachlorbenzol zu einem erheblichen Grad metabolisiert wird und es zu einer Anreicherung der Metabolite, insbesondere von Pentachlorphenol,in den Geweben kommt. Nach den Untersuchungen von Sinclair und Granick (1974) führt Pentachlorphenol zu einer Anreicherung von Uroporphyrin im Medium von Leberzellkulturen. Sie schlossen daraus auf eine Hemmung der Uroporphyrinogen-Decarboxylase. Über den Einfluß von Pentachlorphenol auf den Porphyrin-Stoffwechsel im Warmblüter liegen bislang keine Untersuchungen vor. Diese offene Frage war Ausgangspunkt für die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Experimente.

Da für die Beurteilung der Wirkung der Substanz ihre Pharmakokinetik bekannt sein muß und die in der Literatur vorhandenen Angaben nur ein unvollständiges Bild ergeben (Ahlborg et al., 1974, Deichmann et al., 1942, Jakobson und Yllner, 1971, Weinbach et al., 1965), war es notwendig, die Resorption, Verteilung und Elimination von Pentachlorphenol zu untersuchen. Weiterhin wurde nach subchronischer Applikation von Pentachlorphenol sein Einfluß auf den Porphyrinstoffwechsel untersucht.

3. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

PCP: Pentachlorphenol
TCH: Tetrachlorhydrochinon
ALA: delta-Aminolävulinsäure
PBG: Phorphobilinogen

Zpm: radioaktive Zerfälle pro Minute
Ci: Curie

Erklärungen zu den Abbildungen und Tabellen

n = Anzahl der Tiere

Falls nicht besonders vermerkt, handelt es sich bei den Angaben um Mittelwerte und Standardabweichungen.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. Substanzen

4.1.1. Pentachlorphenol

wurde von der Fluka AG (Schweiz) bezogen. Vor dem Gebrauch wurde die Substanz gereinigt. Um sie von chlorierten Dibenzo-p-Dioxinen und Dibenzofuranen (Buser u. Bosshardt, 1976) abzutrennen, die als Verunreinigung bei der industriellen Synthese von PCP anfallen, wurde die Substanz in o,1 N NaOH gelöst und die erhaltene Lösung mit einem Gemisch aus Cyclohexan und Äther 1 : 1 V/V extrahiert. Der Extrakt wurde verworfen. Nach Ansäuern der wässrigen Phase mit konzentrierter Salzsäure wurde PCP mit Äther extrahiert. Der Äther wurde am Rotavapor verdampft. Das zurück gebliebene PCP wurde mehrmals in einem Gemisch aus Chloroform und n-Pentan 1 : 1 V/V umkristallisiert. Die nach diesen Reinigungsschritten erhaltene weiße, kristalline und geruchlose Substanz hatte einen Schmelzpunkt von 187 - 189,5°C (Res.Rev., 1965 : 19o - 191°C). Ihre chemische Reinheit belief sich bei der gaschromatographischen Prüfung auf über 99,7 %.

4.1.2. Uniform markiertes ^{14}C-Pentachlorphenol

wurde von der Firma Hoechst AG (Frankfurt) bezogen. Es hatte eine spezifische Aktivität von 25,6 µCi/mg. Seine chemische Reinheit belief sich nach der gaschromatographischen Überprüfung auf über 99,8 %. Die radiochemische Reinheit wurde dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel-beschichteten Glasplatten getestet. (Fa. Merck, o,25 mm, 6o F 254) Als Laufmittel diente Benzol. Zur Lokalisation der radioaktiven Substanz wurde ein Dünnschichtscanner der Firma Berthold, Modell LB 2722, benutzt. Der Test ergab eine Reinheit von 99,2 %.

Die dünnschichtchromatographische Prüfung der Substanz im radiochemischen Labor der Herstellerfirma hatte eine radiochemische Reinheit von 1oo % ergeben. Als Trägermaterial

diente Kieselgel S/F und als Laufmittel wurden Benzol, Methanol und Eisessig im Verhältnis 8o : 1o : o,2 verwendet.

4.1.3. Referenzsubstanzen

Als Ausgangssubstanzen standen PCP (MG = 264) und TCH (MG = 246) zur Verfügung. Für die gaschromatographische Analyse wurden beide Substanzen methyliert. Die Schmelzpunkte des methylierten PCP und des methylierten TCH waren 1o3°C (Beilstein, 1944: 1o4 - 1o6°C) bzw. 166°C (Binz und Räth, 1925: 16o°C).

4.2. Versuchstiere und Tierhaltung

Die Experimente wurden mit weiblichen Albinoratten vom Wistarstamm des Zentralinstitutes für Versuchstierzucht, Hannover, durchgeführt. Sie erhielten Altromin-Futter in gepreßter oder in Pulverform und Leitungswasser ad libitum.

Zu Beginn der Versuche betrug das Körpergewicht der Tiere 13o - 18o g. Für die Untersuchungen zur Pharmakokinetik des Pentachlorphenol wurden die Tiere in Stoffwechselkäfigen gehalten. Die Konstruktion der Käfige ermöglichte ein getrenntes Sammeln von Kot, Urin und abgeatmeter Luft. Der Urin wurde während des Sammelns auf - 6° C gekühlt. Die Tagesportionen von Urin und Kot wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei - 18° C aufbewahrt.

Nach jedem Versuch wurden die Käfige mit Leitungswasser und Aceton gespült. In der Spülflüssigkeit fanden sich im Durchschnitt 3 - 4 % der applizierten Radioaktivität. Die gaschromatographische Analyse zeigte, daß sowohl PCP als auch TCH in der Spülflüssigkeit vorhanden waren. Daraus ließ sich schließen, daß die im Käfig verbliebene Radioaktivität aus dem Urin stammte. Die im Urin gemessene Menge an Radioaktivität wurde daraufhin entsprechend korrigiert.

Die im Langzeitversuch untersuchten Tiere wurden in Käfigen mit einem Bodenrost gehalten, um Koprophagie zu verhindern. Zur Uringewinnung für die Bestimmung der Porphyrine wurden

sie in 2-7-tägigen Abständen für jeweils 24 Stunden in Stoffwechselkäfige gesetzt. Die Tiere wurden durch Dekapitieren getötet.

4.3. Applikation von PCP

Markiertes und nicht markiertes PCP wurden in Olivenöl DAB7 gelöst. Die erhaltene Lösung wurde auf eine Konzentration von o,5 % eingestellt. Die spezifische Aktivität des gelösten PCP belief sich auf 6,1 · $1o^6$ Zpm/mg. Die Tiere erhielten intraperitoneal 2oo µl/1oo g ölige Lösung entsprechend 1o mg/kg ^{14}C-PCP oder 4oo µl/1oo g entsprechend 2o mg/kg ^{14}C-PCP. Zur Bestimmung der Resorption nach oraler Applikation erhielten die Tiere ebenfalls 1o mg/kg ^{14}C-PCP durch eine Schlundsonde direkt in den Magen.

Für den Langzeitversuch wurde täglich nicht markiertes PCP an zwei Gruppen von je 15 Versuchstieren mit einer Schlundsonde verabreicht. Eine Gruppe erhielt 5 mg/kg PCP in einer o,25 %igen Olivenöllösung, die andere Gruppe bekam 15 mg/kg PCP in einer o,75 %igen Lösung. Einer Kontrollgruppe von 4 Tieren wurden 2oo µl/1oo g reines Olivenöl DAB 7 appliziert.

4.4. Messung der Radioaktivität in Gewebe, Urin, Kot und Ausatmungsluft

Nach dem Töten der Tiere wurden Gewebsproben von durchschnittlich 5o bis 9o mg und Blutproben von 5o ul entnommen und in Soluene 35o (Sample-Solubilizer, Packard Instruments, USA) gelöst.

Kot wurde mit Methanol im Mengenverhältnis 1 : 4 mit einem Turrax-Stab homogenisiert, 1 Stunde extrahiert und anschließend 1/2 Stunde bei 4ooo U/Minute zentrifugiert. Vom Überstand wurden 1oo µl zur Messung der Radioaktivität abgenommen. Aus dem Sediment wurden Proben zwischen 9o und 1oo mg entnommen und in Soluene gelöst. Vom Urin wurden aliquote Mengen direkt auf ihren Gehalt an Radioaktivität geprüft.

Die in der Ratte verbliebene Radioaktivität wurde nach Auflösen des Tierkörpers in 2 N methanolischer Kalilauge (Petroff et al. 1965) gemessen.

Zur Messung der über die Lungen eliminierten Radioaktivität wurde die im geschlossenen Stoffwechselkäfig abgeatmete Luft durch 2 N methanolische Äthanolaminlösung gesaugt (Kalberer und Rutschmann, 1961). Die Funktionstüchtigkeit der Apparatur wurde mit ^{14}C-markiertem Kohlendioxyd geprüft. Dabei konnte festgestellt werden, daß sich das im Stoffwechselkäfig befindliche Kohlendioxyd quantitativ in der methanolischen Äthanolaminlösung auffangen ließ.

Stark gefärbte Proben mit einem Gewicht von 1oo bis 2oo mg wurden mit 1oo µl 3o %igem Wasserstoffperoxyd in 2oo µl Isopropanol gebleicht. Der Einfluß dieser Behandlung auf den Gehalt an Radioaktivität wurde überprüft. Zu verschiedenen Proben wurde ein ^{14}C-PCP-Standard bekannter Zerfallsrate gegeben, dann wurden sie in Soluene aufgelöst und in oben beschriebener Weise gebleicht. Es konnte kein meßbarer Verlust an Radioaktivität festgestellt werden. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem Flüssigkeits-Scintillationszähler, Modell Tri-Carb, Serie 338o der Firma Packard-Instruments, USA. Dazu wurden die oben beschriebenen Proben zu einem Gemisch aus Scintillator-Toluol und Triton x - 1oo mit einem Volumenverhältnis 2 : 1 (Patterson und Greene, 1965) gegeben.

Die Erfassung der Zählrate in den Proben beruhte auf der Kombination der Verstärkungsverhältnismethode und der Methode des externen Standards (^{14}C-Toluol-Standard, Amersham Buchler, Deutschland, wobei mit Hilfe einer Eichkurve eine rechnerische Korrektur des Zählfehlers vorgenommen wurde (Ruge und Kaczmarczyk, 1967).

4.5. Analyse der Proben

Der Gehalt an chlorierten Phenolen in Blut, Lebergewebe, Kot und Urin wurde gaschromatographisch bestimmt.

Sofort nach dem Töten der Tiere wurden 1 ml Blut und 1 g Lebergewebe entnommen, mit 5 ml o,5 N Perchlorsäure versetzt und homogenisiert. Anschließend wurde mit 1o ml Äther 1 Stunde extrahiert und 1o Minuten bei 4ooo U/Minute zentrifugiert. Danach wurde ein Teil der organischen Phase mit einem gleichen Volumenanteil an ätherischer Diazomethanlösung versetzt (die Synthese von Diazomethan erfolgte nach De Boer und Backer, 1956). Durch die Methylierung der phenolischen OH-Gruppe wird die Flüchtigkeit der Phenole erhöht und dadurch eine bessere gaschromatographische Isolierung erreicht.

Um die Extraktionsausbeute für PCP zu ermitteln, wurde zu 1 ml Blut bzw. 1 g Lebergewebe unmethyliertes ^{14}C-PCP in bekannter Menge gegeben. Die Proben wurden in 5 ml o,5 N Perchlorsäure homogenisiert und 1 Std. mit 1o ml Äther extrahiert. In einem aliquoten Anteil der Ätherphase wurde der Gehalt an Radioaktivität bestimmt. Danach belief sich die Extraktionsausbeute von PCP auf 1o1 $\pm$ 1o %.

Zur Bestimmung der Extraktionsausbeute für TCH wurde zu 1 ml Blut bzw. 1 g Lebergewebe unmethyliertes TCH bekannter Menge gegeben. Nach Zugabe von 5 ml o,5 N Perchlorsäure wurde homogenisiert. Das Homogenat wurde 1 Stunde mit Äther extrahiert. Ein Teil der organischen Phase wurde mit einem gleichen Volumenanteil an ätherischer Diazomethanlösung versetzt.

Die gaschromatographische Messung ergab eine Wiederfindung von TCH in Blut und Leber von 47 $\pm$ 6,9 % bzw. 66,5 $\pm$ 7,8 %. Weitere Extraktionen mit Äther ergaben keine Verbesserung des Ergebnisses. Offenbar wird ein Teil des im Homogenat enthaltenen TCH fest gebunden. Bei der Berechnung der tatsächlich in den Geweben vorkommenden Substanzmengen wurde das Ergebnis der Extraktionsausbeute-Bestimmung berücksichtigt.

Zur Bestimmung der Phenole im Urin wurden 2 ml des 24-Stunden-Sammelurins mit 1 ml 1 N Natronlauge versetzt und das entstandene Gemisch 3 Stunden unter ständigem Rühren in einem auf 7o° C erwärmten Ölbad gehalten. Zur Vermeidung von Verlusten durch Verdampfen wurden die Proben mit Toluol (Sie-

depunkt 11o,8° C) überschichtet. Anschließend wurde der pH der wässrigen Phase mit konzentrierter Salzsäure auf 1 - 2 eingestellt und weitere 3 Stunden im Ölbad bei 7o° C belassen. Nach Abnahme des Toluols wurde die wässrige Phase zweimal mit 5 ml Äther je eine Stunde extrahiert. Die organischen Phasen, bestehend aus Toluol- und Ätherextrakt, wurden vereinigt. Ein Teil davon wurde mit einer gleichen Menge an ätherischer Diazomethanlösung versetzt.

Der Kot wurde im Mengenverhältnis 1 : 4 mit 1 N Natronlauge homogenisiert. Aliquote Anteile von 2 bis 3 ml wurden nach Zugabe von 2 ml Toluol wie bei der Urinaufarbeitung weiterbehandelt.

Die Prüfung des ^{14}C-Gehaltes in der wässrigen und organischen Phase sowie im Sediment ergab, daß durchschnittlich 96 % der im Urin und durchschnittlich 93 % der im Kot befindlichen Radioaktivität mit der organischen Phase extrahiert wurden. Die nicht extrahierbare Radioaktivität wurde den nicht identifizierten Substanzen zugerechnet (vgl. Tabelle 4).

Die unter diesen Bedingungen durchgeführte Aufarbeitung der Urin- und Kotproben führte zu keiner chemischen Veränderung des PCP (Koss et al., 1976).

Die Gewebe-, Kot- und Urinproben der unbehandelten Tiere wurden in gleicher Weise wie oben beschrieben aufgearbeitet, um Leerwerte für die gaschromatographischen Messungen zu erhalten.

Rund 24 Stunden nach Beginn der Methylierung mit Diazomethan wurden Mikroliteranteile der zu untersuchenden Extrakte auf die Säule des Gaschromatographen gegeben. Die quantitative Erfassung der in den Extrakten vorkommenden chlorierten Verbindungen erfolgte durch Vergleich ihrer im Chromatogramm aufgezeichneten Peakhöhen mit denen authentischer Standardsubstanzen.

Die gaschromatographischen Analysen wurden an einem Hewlett-Packard-Modell 575o Research Chromatograph durchgeführt, der

mit einem Elektronen-Einfang-Detektor ausgestattet war. Die Trennung der Substanzen erfolgte auf einer Glassäule von 2,4o m Länge mit einem inneren Durchmesser von 2,8 mm. Sie war gefüllt mit 3 % QF - 1 auf Gaschrom Q 1oo - 12o mesh. Als Trägergas wurde Stickstoff mit einer Durchströmungsgeschwindigkeit von 45 - 5o ml/Minute verwendet. Als Spülgas für den Detektor diente Argon/Methan im Verhältnis 9 + 1.

4.6. Identifizierung der Substanzen

Die Identifizierung der in Urin und Kot ausgeschiedenen Substanzen erfolgte in einem LKB 2o91 Gaschromatograph-Massenspektrometer. Dabei wurde die gaschromatographische Trennung der in den Extrakten enthaltenen Substanzen durchgeführt bei einer Ofentemperatur von 15o° C auf einer 2,7o m x 2 mm (innerer Durchmesser) Glassäule, die mit 3 % QF - 1 auf Gas Chrom Q 8o - 12o mesh gefüllt war. Als Trägergas diente Helium.

4.7. Zellfraktionierung
(nach H.C. Benöhr, W. Franz und K. Krisch, 1966)

Um die intrazelluläre Verteilung der Radioaktivität im Lebergewebe zu untersuchen, erhielten 2 Ratten eine Dosis von je 2o mg/kg ^{14}C-PCP intraperitoneal verabreicht. Nach 9 Stunden wurden die Lebern entnommen und mit einer Schere vorzerkleinert. 2 mal 2 g jeder Leber wurden mit 2 mal 8 ml eiskalter o,25 M Saccharose-Lösung, welche gleichzeitig o,o2 M Trispuffer pH 7,4 enthielt, unter ständiger Kühlung in einem Glashomogenisator mit Teflonstempel (Hersteller: A.H.Thomas Company, Philadelphia 5, USA) 6o Sekunden homogenisiert. Das Homogenat wurde zunächst 3o Minuten bei 1o85 g_{max} zentrifugiert (Sorvall Superspeed Zentrifuge RC2-B, der Firma Du Pont GmbH., Deutschland). Das erhaltene Sediment wurde in 8 ml Saccharoselösung resuspendiert und erneut 3o Minuten bei der gleichen Beschleunigung zentrifugiert. Das hierbei gewonnene Sediment entsprach der Kernfraktion. Die Überstände aus den beiden Zentrifugationsschritten wurden vereinigt

und 3o Minuten bei 12 1oo g_{max} zentrifugiert. Das Sediment wurde in 8 ml Saccharoselösung aufgenommen. Nach nochmaliger Zentrifugation (3o Minuten) bei 12 1oo g_{max} wurde die Mitochondrienfraktion erhalten. Die beiden 12 1oo g_{max} - Überstände wurden vereinigt und 4 Stunden bei 94 5oo g_{max} in der präparativen Ultrazentrifuge Modell L/L2 "Spinco" der Firma Beckman, Deutschland, zentrifugiert. Das Sediment entsprach der Mikrosomenfraktion, der verbleibende 94 5oo g_{max}-Überstand dem Cytoplasma. Nach der Bestimmung des Volumens bzw. des Gewichtes der einzelnen Zellfraktionen wurde ein Aliquot davon mit Soluene versetzt, nach vollständiger Lösung mit Triton-Toluol vermischt und sein Gehalt an Radioaktivität bestimmt.

4.8. Bestimmung der Gesamtporphyrine, der delta-Aminolävulinsäure und von Porphobilinogen im Rattenurin und der Gesamtporphyrine in der Leber

4.8.1. Bestimmung der Gesamtporphyrine

Die im Urin der Ratten befindlichen Gesamtporphyrine wurden über Anionenaustauscher-Chromatographiesäulen (Firma Bio-Rad Laboratories GmbH., München) isoliert (Doss und Schmidt,1971 und Grisler et al., 1972) und mit Hilfe der Spektralphotometrie quantitativ erfaßt. Die Berechnung der Porphyrine im Urin erfolgte anhand der Angaben der Firma Bio-Rad.

Um die Verläßlichkeit der eigenen Bestimmungen zu überprüfen, wurde ein pathologischer Kontrollurin der Firma Cyanamid GmbH., München, Nr. 2921-8o, analysiert. Laut Firmenangabe enthielt der Kontrollurin 32o $\pm$ 1oo µg/l Uroporphyrin und 2o5 $\pm$ 7o µg/l Coproporphyrin, also insgesamt 525 µg/l Gesamtporphyrine. Die eigene Messung ergab für den pathologischen Kontrollurin 446 $\pm$ 33 µg/l Gesamtporphyrine (n = 3).

Die Porphyrine in der Leber wurden bestimmt nach der Methode von Seubert und Seubert (1977).

4.8.2. Bestimmung der delta-Aminolävulinsäure

Die Isolierung der ALA im Urin erfolgte säulenchromatographisch nach Davis und Andelmann (1967) und Doss und Schmidt (1971). Die quantiative Bestimmung wurde spektralphotometrisch anhand der Angaben der Firma Bio-Rad durchgeführt.

Um die Richtigkeit der eigenen Messungen zu überprüfen, wurde ebenfalls anhand der Angaben der Firma Bio-Rad ein pathologischer Kontrollurin der Firma Cyanamid GmbH., München, Nr. 2921-8o aufgearbeitet. Die Konzentration dieses Urins war mit 5 $\pm$ 1,5 μg ALA pro o,5 ml angegeben. Die eigene Messung ergab 6,7 $\pm$ o,6 μg ALA pro o,5 ml Urin (n = 3).

4.8.3. Bestimmung von Porphobilinogen

PBG wurde nach der Arbeitsanleitung der Firma Bio-Rad und nach Doss und Mitarbeiter (1971) ebenfalls mit dem Bio-Rad-Säulentest isoliert und mit dem Spektralphotometer quantitativ erfaßt. Die Berechnung des PBG-Gehaltes im Urin erfolgte anhand einer Eichkurve. Ihre Werte wurden erhalten nach Messung der Extinktion einer PBG-Stammlösung; PBG wurde von Sigma (USA) bezogen.

5. ERGEBNISSE

5.1. Untersuchungen zur Pharmakokinetik der applizierten Radioaktivität

5.1.1. Resorption von Radioaktivität nach einmaliger enteraler bzw. parenteraler Gabe von ^{14}C-PCP

Um festzustellen, in welchem Ausmaß PCP aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert wird, wurde der Gehalt an Radioaktivität in der Leber nach oraler bzw. intraperitonealer Applikation gemessen. Die Tiere erhielten jeweils eine einmalige Dosis von 1o mg/kg ^{14}C-PCP. Aus der Gegenüberstellung des ^{14}C-Gehaltes in den Lebern ist zu ersehen, daß nach oraler Gabe nur geringfügig weniger an Radioaktivität wiedergefunden wurde als nach intraperitonealer Verabreichung (Tabelle 1). Daraus läßt sich auf eine nahezu vollständige Resorption des verabfolgten ^{14}C-PCP aus dem Magen-Darm-Trakt schließen.

Zur Bestimmung der Resorptionsgeschwindigkeit nach intraperitonealer Applikation wurde 9 Stunden nach einer Injektion von 1o mg/kg ^{14}C-PCP das Abdomen eines Tieres mit einem Gemisch aus Methanol und n-Hexan (V/V 1 : 1o) gespült. In der Spülflüssigkeit fanden sich nur 2 - 3 % der injizierten Radioaktivität. Nach 9 Stunden war somit nahezu die gesamte verabreichte Radioaktivität resorbiert.

Tabelle 1: Wiederfindung von Radioaktivität in der Leber nach intraperitonealer bzw. oraler Gabe von 1o mg/kg ^{14}C-PCP

Zeit nach Applikation	nCi/g Leberfrischgewicht			
	i.p.	n	p.o.	n
24 h	27 ± 7	3	23 ± 1	3
48 h	13 ± 4	3	1o ± 1	3

5.1.2. Versuch einer Bilanzierung der applizierten Radioaktivität

Um Aufschluß über den Verbleib der applizierten Radioaktivi-

tät nach intraperitonealer Gabe von ^{14}C-PCP zu erhalten, wurde eine Bilanzierungsstudie an 5 Ratten durchgeführt. Die Tiere erhielten eine einmalige Dosis von 1o mg/kg ^{14}C-PCP. Danach wurde der ^{14}C-Gehalt im Tier und in seinen Ausscheidungsprodukten gemessen. Aus Tabelle 2 ist ersichtlich, daß zusammen insgesamt 94 bis 1o3 % der applizierten Radioaktivität im Tier und in Urin und Kot wiedergefunden wurden.

In einem zusätzlichen Experiment wurde nach intraperitonealer Gabe von 2o mg/kg ^{14}C-PCP (= 12,1 · $1o^6$ Zpm) die Ausatmungsluft über einen Zeitraum von 24 Stunden auf Kohlenstoff-14 geprüft. Dabei ergab sich kein Anhalt für die Ausscheidung von Radioaktivität über die Lungen.

5.1.3. Verteilung und Elimination der Radioaktivität in den Geweben

Nach intraperitonealer Applikation von 1o mg/kg ^{14}C-PCP wurden die Gewebe der behandelten Tiere auf ihren Gehalt an Kohlenstoff-14 untersucht. Dabei wurde in allen untersuchten Geweben Radioaktivität nachgewiesen. Die höchsten Konzentrationen an Kohlenstoff-14 fanden sich in Leber, Niere und Blut. Niedrigere ^{14}C-Konzentrationen wurden im Fettgewebe (perirenal), im Muskel (Quadriceps femoris) und im Gehirn festgestellt (Abbildung 1). Darüberhinaus wurden bei einigen Tieren auch die Gewebe der Lunge, der Nebenniere, des Herzens und der Milz auf ihren Gehalt an Radioaktivität geprüft. Die Konzentration an Kohlenstoff-14 in diesen Organen war geringer als in der Leber, jedoch höher als im Fettgewebe. Das Muster der ^{14}C-Verteilung blieb während des angegebenen Versuchszeitraumes annähernd gleich.

Die Elimination der Radioaktivität aus den Geweben erfolgte relativ rasch. Innerhalb von 144 Stunden sank die ^{14}C-Konzentration in Leber und Niere auf rund 5 % ihrer Maximalwerte. Für die übrigen in Abbildung 1 aufgeführten Gewebe wurde die Elimination der Radioaktivität nur bis zur 72-igsten Stunde angegeben, da ihre äußerst geringe Konzentration zur 144-igsten Stunde eine sichere Aussage über ihren tatsächlichen Wert nicht mehr zuließ.

Die in Abbildung 1 dargestellten Kurven deuten auf eine Änderung der Eliminationsgeschwindigkeit hin. Aus dem annähernd linearen Verlauf der Eliminationskurven zwischen der 9-ten und 48-igsten Stunde läßt sich eine Halbwertszeit von durchschnittlich 12 Stunden abschätzen, während aus den Eliminationskurven von Leber und Niere zwischen der 48-igsten und der 144-igsten Stunde eine biologische Halbwertszeit von durchschnittlich 5o Stunden hervorgeht.

Tabelle 2: Wiederfindung von Radioaktivität in 5 Ratten und ihren Ausscheidungsprodukten nach einmaliger intraperitonealer Gabe von 1o mg/kg ^{14}C-PCP

Zeit nach Applikation in Stunden	Prozent der applizierten Menge an Kohlenstoff-14 in:			Gesamt-Radioaktivität in Prozent
	Tierkörper	Urin	Kot	
9	69,8	23,7	o,1	93,5
24	33,8	39,o	29,2	1o2,o
48	11,o	38,o	51,6	1oo,6
72	28,o	36,3	38,7	1o3,o
144	11,9	6o,7	22,5	95,1

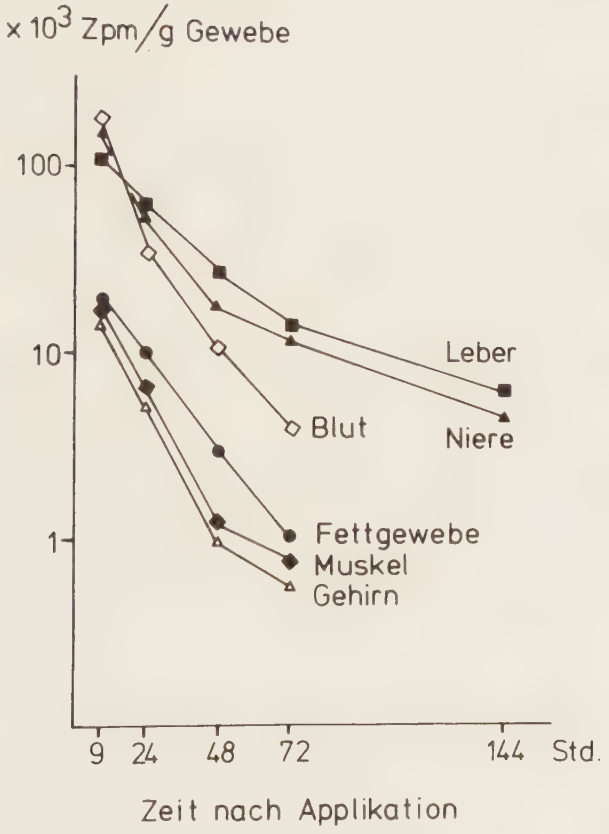

Abbildung 1:

Verteilung und Elimination von Kohlenstoff-14 in Blut und Gewebe von Ratten nach intraperitonealer Applikation von 1o mg/kg ^{14}C-Pentachlorphenol (n = 3)

5.1.4. Ausscheidung von Radioaktivitat mit Urin und Kot

Die Elimination von Kohlenstoff-14 über die Nieren und mit dem Darminhalt wurde nach einmaliger intraperitonealer Injektion von 1o mg/kg ^{14}C-PCP untersucht.

Wie aus der Abbildung 2 hervorgeht, ist sowohl im Urin als auch im Kot Radioaktivität enthalten. Bereits nach 48 Stunden finden sich in den Ausscheidungsprodukten der Ratte insgesamt ca. 75 % der verabreichten Radioaktivität wieder. Nach 6 Tagen wurde der Versuch beendet. Während dieser Zeit ist über die Nieren etwa zweimal soviel an Radioaktivität ausgeschieden worden wie mit dem Kot.

5.2. Isolierung, Identifizierung und Messung der in Kot, Urin und Gewebe enthaltenen chlorierten Verbindungen

5.2.1. Identifizierung der ausgeschiedenen Substanzen

Die Chromatogramme der gaschromatographischen Analyse der Kot- und Urinextrakte enthielten 1 bzw. 2 Peaks (siehe Abbildung 3), die nicht bei der Untersuchung von Kontrollextrakten beobachtet wurden. Durch den Vergleich der Retentionszeiten dieser Peaks mit denen von Referenzsubstanzen ergab sich ein erster Hinweis darauf, daß es sich bei den im Urin ausgeschiedenen Substanzen um PCP und TCH und im Kot um PCP handelte. Zur eindeutigen Identifizierung dieser Verbindungen wurden die methylierten Extrakte in der kombinierten Gaschromatographie-Massenspektrometrie analysiert (Abbildungen 4 und 5). Die dabei aufgezeichneten Massenspektren wiesen die gleichen Charakteristika auf wie die Methyläther von PCP und TCH. Sowohl die aus Urin und Kot isolierten Verbindungen als auch die Vergleichssubstanzen zeigten Molekülionenpeaks bei m/e 278 und m/e 274 und Isotopenmuster, wie sie für Substanzen mit 5 bzw. 4 Chlor-Atomen typisch sind.

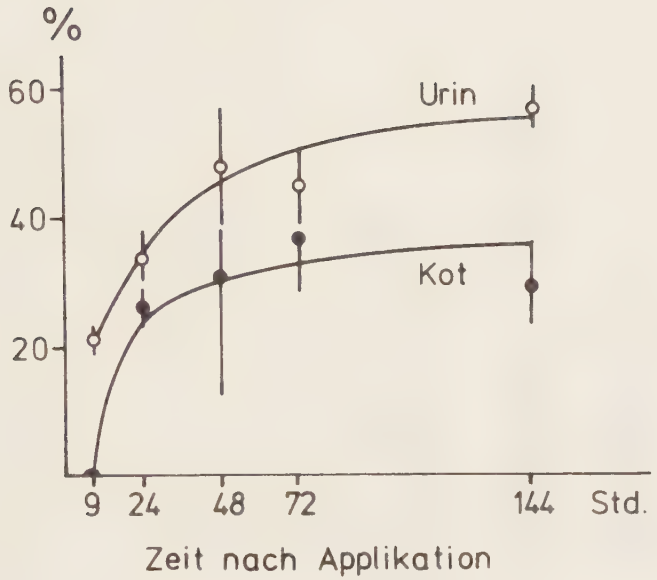

Abbildung 2:

Kumulative Darstellung der Ausscheidung von Radioaktivität im Urin und im Kot von Ratten nach intraperitonealer Applikation von 1o mg/kg ^{14}C-Pentachlorphenol (n = 3).
Die in Urin und Kot angegebene Radioaktivität ist in Prozent der applizierten Dosis angegeben.

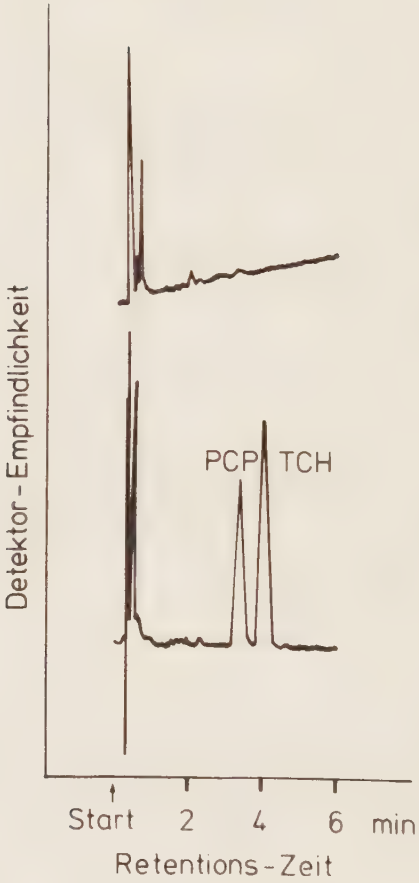

Abbildung 3:

Gaschromatogramm des methylierten Urinextraktes von unbehandelten (oben) und Pentachlorphenol-behandelten Tieren (unten).
GC-Bedingungen: Glassäule (2,4o m Länge, 2,8 mm i.D.), gefüllt mit 3 % QF-1 auf Gaschrom Q 1oo - 12o mesh. Trägergas N_2, 45 - 5o ml/min., Detektor: ECD

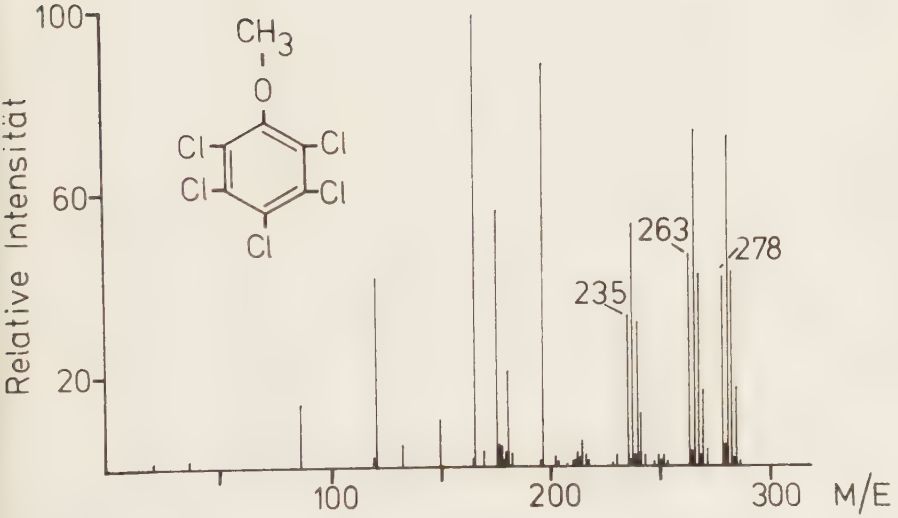

Abbildung 4:

Massenspektrum des methylierten Pentachlorphenols nach vorangegangener gaschromatographischer Isolierung aus dem methylierten Urinextrakt von Pentachlorphenol-behandelten Ratten.

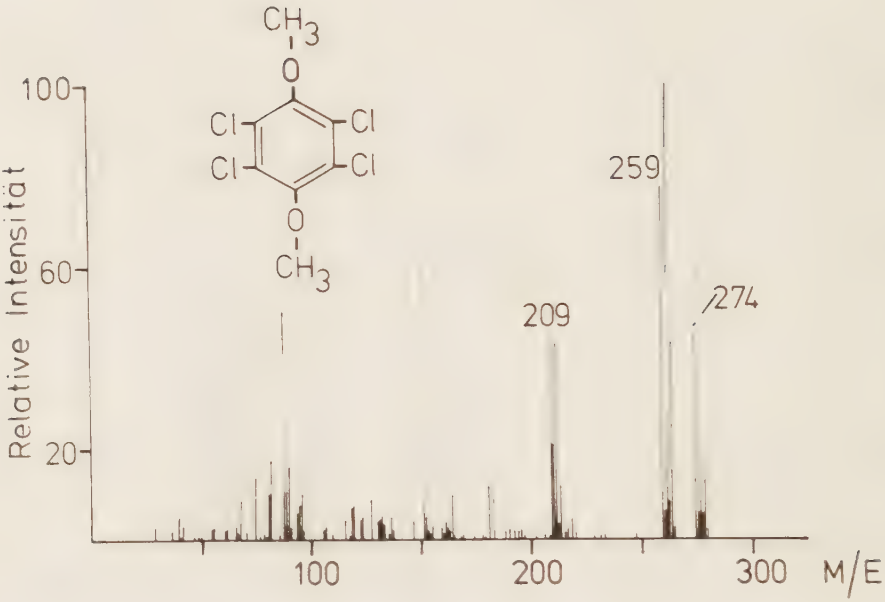

Abbildung 5:

Massenspektrum des methylierten Tetrachlorhydrochinon nach vorangegangener gaschromatographischer Isolierung aus dem methylierten Urinextrakt von Pentachlorphenol-behandelten Ratten.

5.2.2. Messung der Radioaktivitat und der Chlorverbindungen im Lebergewebe

Um zu erfahren, in welchen Substanzen die in der Leber nachgewiesene Radioaktivität enthalten war, wurden die Extrakte dieses Organs gaschromatographisch analysiert. Parallel dazu wurde der Gehalt an Radioaktivität im Ätherextrakt, in der wässrigen Phase und im Sediment bestimmt.

In Abbildung 6 ist das Ergebnis dieses Experiments graphisch dargestellt. Aus der Zeichnung ist ersichtlich, daß sich über den gesamten Versuchszeitraum immer nur eine bestimmte Menge an Radioaktivität mit Äther extrahieren läßt. Von besonderem Interesse ist, daß vom 2. Tag nach Applikation von ^{14}C-PCP dieser extrahierbare Anteil trotz erschöpfender Extraktion mit Äther stark abnimmt, während der überwiegende Anteil an Kohlenstoff-14 in der wässrigen Phase und im Sediment zurückbleibt.

Um festzustellen, ob es sich bei den nichtextrahierbaren Substanzen um hydrophile Konjugate des PCP und TCH handelt, wurden die Leberhomogenate mit 1 N Natronlauge ebenso wie der Urin erwärmt, anschließend angesäuert und mit Äther extrahiert. Durch dieses Verfahren wurden nur noch ca. 1o % der im Leberhomogenat enthaltenen Radioaktivität extrahiert. In diesen Extrakten ließ sich gaschromatographisch nur PCP eindeutig nachweisen.

Mit Hilfe der Gaschromatographie wurde in der ätherischen Phase der Gehalt an PCP und TCH bestimmt und die in beiden Substanzen enthaltene Radioaktivität auf der Basis der spezifischen Aktivität des applizierten PCP berechnet. Danach waren 3o - 7o % der Aktivität in PCP und 5 - 1o % in TCH enthalten. Der restliche Anteil an markierten Substanzen, die sich im organischen Extrakt nachweisen ließen, konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert werden.

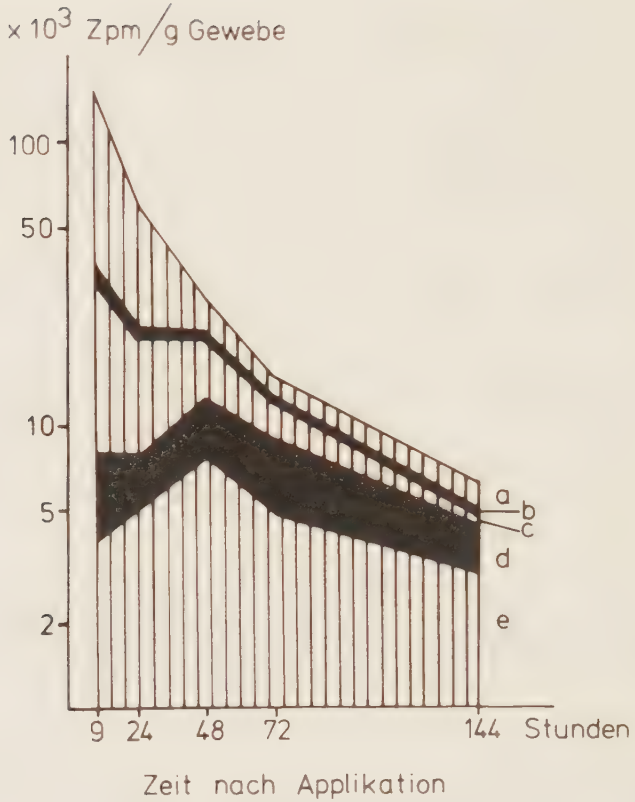

Abbildung 6:

Verteilung der in der Leber gefundenen Radioaktivität im Ätherextrakt in der wässrigen Phase und im Sediment und Verteilung der im Ätherextrakt festgestellten Radioaktivität in Pentachlorphenol und Tetrachlorhydrochinon.

a = gaschromatographisch bestimmtes Pentachlorphenol im Ätherextrakt
b = gaschromatographisch bestimmtes Tetrachlorhydrochinon im Ätherextrakt
c = nicht identifizierte Substanzen im Ätherextrakt
a + b + c = Gesamtradioaktivität im Ätherextrakt
d = mit Äther nicht extrahierbare Radioaktivität in der wässrigen Phase
e = mit Äther nicht extrahierbare Radioaktivität im Sediment
(die zu den angegebenen Zeiten eingetragenen Werte wurden erhalten nach Aufarbeitung von Lebern von jeweils 3 Tieren)

Um zu prüfen, wie sich die Radioaktivität intracellulär verteilt, wurde Lebergewebe durch Zentrifugieren in subzelluläre Fraktionen getrennt und die nach der Zentrifugation erhaltenen Fraktionen auf ihren Gehalt an Radioaktivität untersucht. Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, enthalten die Fraktionen der Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und des Cytoplasmas annähernd gleiche Anteile an der in der Leber festgestellten Radioaktivität.

Tabelle 3: Relative Verteilung der in der Leber nachgewiesenen Radioaktivität in den verschiedenen Zellfraktionen *

Zellfraktion	Relative Verteilung der in der Leber nachgewiesenen Radioaktivität in Prozent
Kerne	27,2 ± 11,1
Mitochondrien	23,7 ± 12,o
Mikrosomen	24,4 ± 1,o
Cytoplasma	27,6 ± 3,8
	1o2,9 ± 3,9 **

* untersucht wurden 2 mal 2 g Leber von 2 Tieren 9 Stunden nach i.p. Applikation von 2o mg/kg ^{14}C-Pentachlorphenol

** wiedergefundene Gesamtaktivität in Prozent der in der Leber enthaltenen Radioaktivität

5.2.3. Messung von PCP und TCH in Kot und Urin

Die gaschromatographische Analyse der Extrakte aus den Exkrementen ergab, daß im Urin PCP und TCH in nahezu gleicher Menge enthalten sind. Im Kot ließ sich dagegen nur PCP nachweisen. Aus den in Tabelle 4 dargestellten Werten läßt sich abschätzen, daß etwa 3/4 der i.p. applizierten Substanz in unveränderter Form mit Kot und Urin wieder ausgeschieden wird.

Tabelle 4: Relative Verteilung der in Urin und Kot enthaltenen Radioaktivität auf Pentachlorphenol und Tetrachlorhydrochinon 24 Stunden nach intraperitonealer Gabe von ^{14}C-Pentachlorphenol.

	P C P %	T C H %	nicht identifizierte Substanzen %
Urin	41,8 ± 12,1	55,3 ± 1o,6	2,9 ± 2,6
Kot	93,o ± 9,5	-*	7,o ± 5,7

* Unterhalb der Nachweisgrenze von O.O1 µg/g,

5.3. Das Verhalten von PCP bei subchronischer Applikation

Um das Verhalten von PCP nach subchronischer Applikation und seinen Einfluß auf die Ausscheidung von Porphyrinvorstufen und Porphyrinen zu prüfen, wurden weiblichen Ratten über einen Zeitraum von 4 Wochen täglich 5 bzw. 15 mg/kg PCP per Schlundsonde direkt in den Magen appliziert.

Während der Versuchsdauer unterschieden sich die behandelten Ratten in Aussehen und Verhalten nicht von den Kontrolltieren. Die Zunahme des Körpergewichts der behandelten Tiere erfolgte in gleichem Maße wie bei den unbehandelten Tieren (vgl. Abbildung 7).

5.3.1. Konzentration von PCP und TCH in den Geweben

Mit Hilfe der Gaschromatographie wurde im Verlauf des Versuches der Gehalt an PCP und TCH im Blut, im Leber- und Nierengewebe bestimmt. Wie aus der Abbildung 8 zu ersehen ist, wurde etwa 2 Wochen nach Beginn der Applikation von 15 mg/kg PCP in den Geweben ein annähernd konstant bleibender Gehalt an PCP und TCH beobachtet. Er belief sich auf 2o - 25 ppm PCP und 1 - 4 ppm TCH. Eine Woche nach Ende der Applikation von PCP fanden sich in den Geweben noch durchschnittlich o,13 ppm PCP und durchschnittlich o,o8 ppm TCH.

In einem parallel laufenden Experiment wurden 5 mg/kg PCP ebenfalls über 4 Wochen verabfolgt. Zu allen Zeitpunkten fanden sich in den untersuchten Geweben der behandelten Tiere durchschnittlich 3-fach geringere Konzentrationen an PCP und TCH.

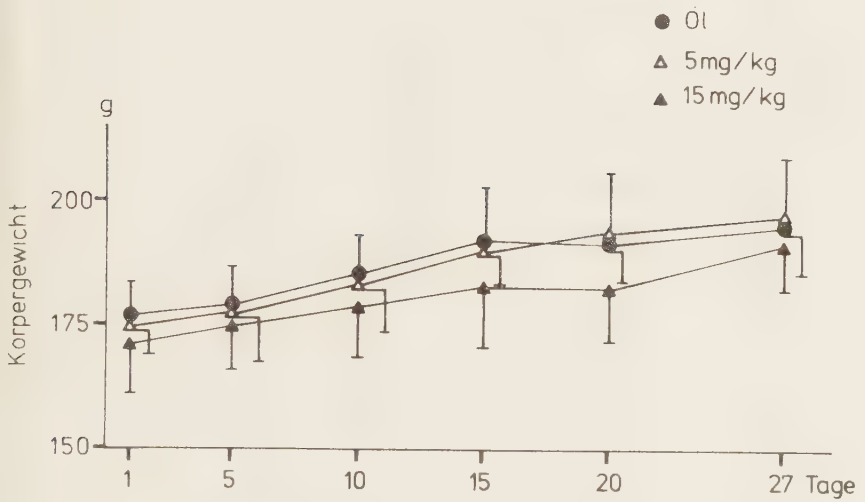

Abbildung 7:

Entwicklung des Körpergewichtes weiblicher Ratten bei täglicher oraler Applikation von 5 mg/kg Pentachlorphenol, 15 mg/kg Pentachlorphenol und Olivenöl

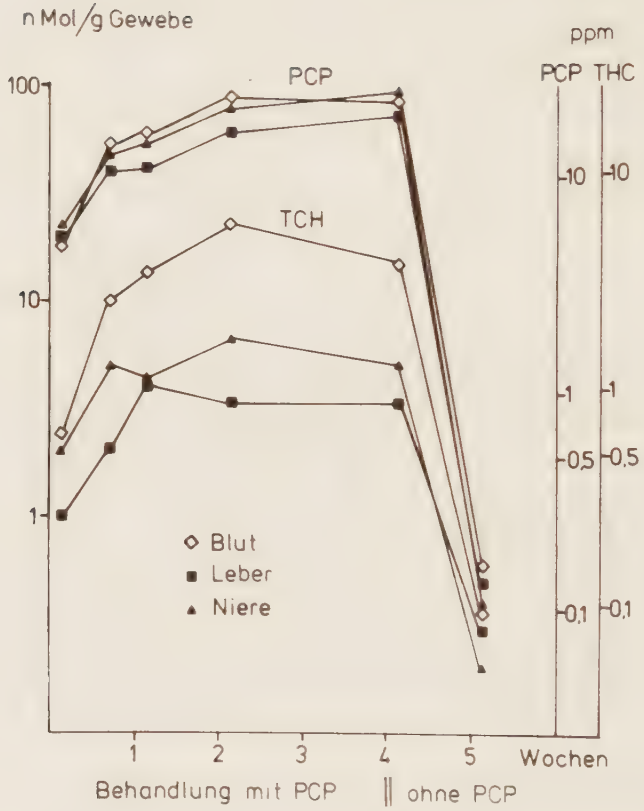

Abbildung 8:

Gehalt an Pentachlorphenol und Tetrachlorhydrochinon in 1 g Gewebe bzw. 1 ml Blut von Ratten nach täglicher oraler Gabe von 15 mg/kg Pentachlorphenol (n = 3).

5.3.2. Gehalt an Porphyrinvorstufen und an Gesamtporphyrinen im Urin und in der Leber

Von den Tieren, die täglich 15 mg/kg PCP erhielten, wurde der 24-Stunden-Sammelurin nach verschiedenen Zeitabschnitten auf seinen Gehalt an ALA, PBG und Gesamtporphyrinen untersucht. In Tabelle 5 ist das Resultat dieser Experimente zusammengefaßt. Die Werte lassen erkennen, daß sich die Tagesausscheidung von ALA, PBG und Gesamtporphyrinen im Urin der behandelten Tiere nicht von der der Kontrolltiere unterschied.

Darüberhinaus wurde eine Auftrennung der mit dem Urin ausgeschiedenen Porphyrine vorgenommen. Die Analyse ergab, daß sich der relative Gehalt an Porphyrinen unter dem Einfluß von PCP nicht änderte (siehe Tabelle 6). Sowohl im Urin der unbehandelten als auch der behandelten Tiere belief sich der Anteil an Koproporphyrin (4 Carboxylgruppen) auf rund 4o %, an Protoporphyrin (2 Carboxylgruppen) und Uroporphyrin (8 Carboxylgruppen) auf jeweils 1o - 2o %. Der Anteil der Porphyrine mit 3, 5, 6 bzw. 7 Carboxylgruppen lag zwischen jeweils rund 3 und 13 %.

4 Wochen nach Behandlungsbeginn wurde in den Lebern der Versuchstiere der Gehalt an Porphyrinen bestimmt. Dabei wurden in den mit PCP behandelten Ratten o,92 $\pm$ o,61 μg/g Leberfrischgewicht und in den nur mit Olivenöl behandelten Tieren o,51 $\pm$ o,19 μg/g Leberfrischgewicht festgestellt. Aus der Gegenüberstellung der Daten läßt sich nicht auf einen Einfluß von PCP auf den Porphyringehalt in der Leber schließen.

Tabelle 5: Tagesausscheidung von delta-Aminolävulinsäure, Porphobilinogen und Gesamtporphyrine im Urin weiblicher Ratten nach täglicher oraler Gabe von 15 mg/kg Pentachlorphenol (n = 3)

Behandlung	Tag	ug im 24-Stunden-Urin		
		A L A	P B G	Gesamt-porphyrine
Kontrolle*	1	1o,3 ± 1o,8	6,7 ± 3,9	2,7 ± o,2
Kontrolle*	28	18,4 ± 9,1	8,9 ± 5,2	2,6 ± 1,1
PCP**	1	1o,7 ± 8,9	7,8 ± 2,4***	1,4 ± 1,1
PCP**	8	17,8 ± 4,3	5,5 ± 2,2	2,4 ± o,4
PCP**	29	12,o ± 1,4	5,6 ± 1,5	1,8 ± o,3

* behandelt mit 2 ml/kg Olivenöl

** behandelt mit 15 mg/kg PCP gelöst in 2 ml Olivenöl

*** Behandlungs-Dauer 5 Tage

Tabelle 6: Relativer Porphyringehalt im Urin von Ratten nach oraler Gabe von Pentachlorphenol bzw. Öl (Kontrolle)

Behandlung	Tage	Prozentualer Anteil der Porphyrine mit 8 und weniger Carboxylgruppen						
		8	7	6	5	4	3	2
Kontrolle*	1	15,1±15,4	6,5±6,8	4,2±5,5	Spuren	46,8±19,3	6,9±5,4	17,2± 2,9
Kontrolle*	28	11,4± 9,7	6,7±4,4	7,8±4,5	3,1±2,5	4o,6±13,6	12,5±3,4	18,2±1o,o
PCP**	5	17,5± 9,3	8,5±5,1	5,9±4,4	7,4±5,9	44,8±11,o	9,3±4,4	8,5± 5,7
PCP**	28	15,6± 3,o	8,4±2,2	8,o±5,9	4,3±2,9	36,3± 7,6	11,4±2,5	16,3± 4,2

* behandelt mit 2ml/kg Olivenöl

** behandelt mit 15mg/kg Pentachlorphenol, gelöst in 2 ml Olivenöl

6. DISKUSSION

Zur Beantwortung der Frage, ob nach Gabe von PCP toxische Effekte im Organismus der Ratte zu beobachten sind, waren Untersuchungen über die Pharmakokinetik notwendig. In diesem Zusammenhang mußte geklärt werden, ob PCP in ausreichender Menge enteral resorbiert wird und eine Verteilung in die Gewebe stattfindet. Nur wenn dieser Beweis erbracht worden war, konnte von einer wirksamen Substanzkonzentration im Organismus ausgegangen werden.

Aus den durchgeführten Experimenten ist zu erkennen, daß das radioaktiv markierte PCP nahezu vollständig aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert wird, und in allen untersuchten Geweben radioaktive Substanz enthalten ist. Besonders hohe Konzentrationen an Radioaktivität wurden in der Leber, in der Niere und im Blut gefunden. Vor allem durch den hohen Gehalt an Kohlenstoff-14 in der Leber war die Möglichkeit eines Einflusses auf Funktionen dieses Organes, wie z.B. auf den Porphyrinstoffwechsel, gegeben. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß es sich bei der im Gewebe festgestellten Radioaktivität nicht nur um PCP sondern auch um Metabolite handelt. So konnte bei den eigenen Versuchen in allen Geweben und im Urin TCH nachgewiesen werden. Ahlborg und Mitarbeiter (1974) fanden darüberhinaus noch Trichlorhydrochinon.

Im Hinblick auf die Frage, ob es zu einer spezifischen Reaktion der verabfolgten Substanz mit dem untersuchten Gewebe kommt, ist die Tatsache von Bedeutung, daß sich beim Versuch, die Radioaktivität aus den Geweben behandelter Tiere zu isolieren, nur ein Teil extrahieren läßt, während ein anderer Teil im Gewebe verbleibt. Für dieses Verhalten sind mehrere Erklärungen möglich, die im folgenden kurz diskutiert werden sollen:
Zunächst wäre das sogenannte "Trapping" von PCP und seiner Metabolite, entweder durch die ganze Zelle oder durch einzelne Zellorganellen, in Betracht zu ziehen. Man versteht darunter

die Aufnahme insbesondere fettlöslicher Substanzen über die lipophile Membran der Zelle und die begrenzte Abgabe der intrazellulär gebildeten hydrophilen Metabolite. Da jedoch die Membranen der Zelle und ihrer Organellen durch Einfrieren, Auftauen vor der Aufarbeitung und Homogenisierung zerstört wurden, kann diese Art des Festhaltens keine Bedeutung für die Retention von Kohlenstoff-14 haben.
Eher wäre denkbar, daß PCP oder einer seiner Metabolite durch bestimmte Zellstrukturen kovalent gebunden wird. Allerdings liegen bislang keine Untersuchungen vor, ob diese Substanzen eine derartige Bindung mit Makromolekülen eingehen. Weinbach und Mitarbeiter (1965) beobachteten jedoch, daß PCP fest an die Mitochondrien gebunden wird. Dabei glaubten sie, Anhaltspunkte dafür zu haben, daß insbesondere der Proteinanteil dieser Zellorganellen den Fremdstoff bindet. Aus den eigenen Experimenten geht hervor, daß die im Gewebe nachgewiesene Radioaktivität zu jeweils gleichen Teilen auf die vier einzelnen Zellfraktionen verteilt ist. Dieser Befund ist insofern interessant, als die Fraktionen der Zellkerne nur 13 % der in der Leber befindlichen Eiweiße enthalten gegenüber 39 % in der Fraktion des Cytoplasmas (Rauen, 1964). Möglicherweise wird PCP nicht nur an verschiedene Proteine sondern auch an andere Makromoleküle gebunden.

Schließlich muß noch die Adsorption der Substanz an die Oberfläche von Zellbestandteilen in Erwägung gezogen werden. Da jedoch die Wiederfindungsversuche für PCP eine 1oo %-ige Extraktionsausbeute ergaben, kann Adsorption nicht die entscheidende Ursache für das starke Festhalten im Gewebe sein.

Die begrenzte Extrahierbarkeit von PCP und möglicherweise TCH aus dem Gewebe könnte von toxikologischer Bedeutung sein. Mehr als Beweis der Verteilung in die Gewebe läßt das "Festhalten" von Radioaktivität durch subzelluläre Strukturen auf eine Beeinflussung biochemischer Prozesse schließen. Welche subzellulären Strukturen jedoch betroffen sind, ist noch weitgehend ungeklärt. Aus den eigenen Experimenten geht hervor, daß die Substanzen von den Kernen, den Mitochondrien,

den Mikrosomen und vom Cytosol festgehalten werden. Dies deckt sich auch mit Befunden von Arrhenius und Mitarbeitern (1977), die PCP gaschromatographisch in allen Zellfraktionen nachgewiesen haben. Allerdings erfaßten sie nur den extrahierbaren Anteil von PCP. Durch die Verwendung von radioaktiv markierter Substanz im eigenen Versuch konnte gezeigt werden, daß ein beträchtlicher Anteil an Radioaktivität auch nach erschöpfender Extraktion im denaturierten Gewebe verbleibt.

Mit der Tatsache, daß sich stets nur ein Teil der im Gewebe festgestellten Radioaktivität mit Äther extrahieren läßt, steht sicherlich auch die Änderung der Ausscheidungsgeschwindigkeit während verschiedener Phasen der Elimination in Zusammenhang. Bereits Larson (1972) stellte fest, daß die PCP-Ausscheidung über den Urin in zwei Phasen verläuft. Er beobachtete ebenfalls eine relativ rasche Ausscheidung innerhalb der ersten Stunden nach Applikation und eine wesentlich langsamere Elimination von der 48-igsten Stunde an. Allerdings berücksichtigte er nicht die Ausscheidung über den Darm. Die Abnahme der Ausscheidungsgeschwindigkeit könnte darauf zurückzuführen sein, daß PCP und TCH nicht nur in freier sondern auch in gebundener Form (siehe oben) vorkommen. Ein weiterer Grund für die verzögerte Elimination könnte die Bindung dieser Substanzen an Glucuronsäure sein (Jacobsen et al., 1971, Ahlborg et al., 1978). Die damit verbundene Veränderung der Eigenschaften des Moleküls hat sicher zweifellos zur Folge, daß die Substanzen eine andere Eliminationskinetik haben. Inwieweit der von Braun und Mitarbeiter (1976), (1977) vermutete enterohepatische Kreislauf eine zusätzliche Rolle bei der Ausscheidung dieser Chlorphenole spielt, läßt sich bislang nicht sagen.

Auf Grund der eigenen Befunde werden nahezu 25 % des verabfolgten PCP in TCH umgewandelt. Nach Ahlborg und Mitarbeiter (1974) und (1978) entstehen darüberhinaus noch Spuren von Trichlorhydrochinon. Über den eigentlichen Prozeß, der zur

Bildung beider Metabolite führt, ist nichts bekannt. Für eine weitere Betrachtung des Verhaltens von PCP im Warmblüterorganismus ist jedoch die Kenntnis dieser Prozesse, die zur Bildung von TCH und Trichlorhydrochinon führen, unerläßlich.

Wenn zu erwarten ist, daß PCP im Warmblüter zur Störung der Porphyrinsynthese führt, dann hätten nach langfristiger Gabe dieser Substanz meßbare Veränderungen im Gehalt der Porphyrine und ihrer Vorstufen auftreten müssen. Die durchgeführten Experimente ließen jedoch keinen direkten Einfluß des PCP auf den Porphyrinstoffwechsel erkennen. Damit bestätigen sich die Befunde von Goldstein und Mitarbeiter (1976), die PCP über 8 Monate an weibliche Ratten verfütterten, ohne Anzeichen für die Auslösung einer Porphyrie zu erhalten. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß PCP unter anderen als im eigenen Experiment gewählten Bedingungen dennoch in den Porphyrinstoffwechsel eingreift.
Sinclair und Granick (1974) beobachteten bei in vitro-Versuchen, daß PCP nur in Anwesenheit einer erhöhten ALA-Konzentration zu einer vermehrten Bildung von Uroporphyrin führt. Offenbar muß eine hohe Konzentration an dieser Porphyrin-Vorstufe vorhanden sein, damit in der geschädigten Zelle eine vermehrte Bildung von Porphyrinen einsetzen kann. In vivo müßte daher geprüft werden, ob PCP oder ein anderer Metabolit des Hexachlorbenzol bei gleichzeitiger Gabe von ALA zu einer Störung des Porphyrinstoffwechsels führt.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ahlborg, U.G., Lindgren, I.E., Mercier, M.:
Metabolism of Pentachlorophenol, Arch. Toxicol. 32, 271-281 (1974)

2. Ahlborg, U.G. in:
Pentachlorophenol. Chemistry, Pharmacology, and Environmental Toxicology, 12, 115-129 (1978)
Ed. by Rao, K.R.
Plenum Press, New York, London

3. Arrhenius, E., Renberg, L., Johansson, L.:
Subcellular distribution, a factor in risk evaluation of pentachlorophenol. Chem.-Biol. Interactions, 18, 23-34 (1977)

4. Beilsteins Handbuch der organischen Chemie, Zweites Erganzungswerk, Vol. 6, p. 183, Berlin: Springer 1944

5. Benöhr, H.C., Franz, W., Krisch, K.:
Carboxylesterasen der Mikrosomenfraktion. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. u. exp. Path. 255, 163-177 (1966)

6. Binz, A., Räth, C.:
Zur Konstitution des Schwefelblaus. Ber. dtsch. chem. Ges. (B) 58, 3o9-313 (1925)

7. Braun, W.H., Sauerhoff, M.W.:
The Pharmacokinetic Profile of Pentachlorophenol in Monkeys Toxicol. Appl. Pharmacol. 38, 525-533 (1976)

8. Braun, W.H., Young, J.D., Blau, G.E., Gehring, P.J.:
The Pharmakokinetics and Metabolism of Pentachlorophenol in Rats.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 41, 395-4o6 (1977)

9. Buser, H.-R., Bosshardt, H.P.:
Determination of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans in Commercial Pentachlorophenols by Combined Gas Chromatography-Mass-Spectrometry.
Journal of the AOAC, 59, 562-569 (1976)

1o. Davis, I.R., Andelman, S.L.:
Urinary delta-aminolevulinic acid (ALA) levels in lead poisoning II. A modified method for the rapid determination of urinary delta-aminolevulinic acid using disposable ionexchange chromatography columns.
Arch. Environ. Health, 15, 53 (1967)

11. De Boer, Th.J., Backer, H.J.:
Organic Syntheses, 86, 16-19 (1956)

12. Deichmann, W., Machle, W., Kitzmiller, K.V., Thomas,G.:
Acute and chronic effects of pentachlorophenol and sodium pentachlorophenate upon experimental animals.
J. Pharmacol. exp. Ther. 76, 1o4-117 (1942)

13. Doss, M., Schmidt, A.:
Quantitative Bestimmung von delta-Aminolävulinsäure und Porphobilinogen im Urin mit Ionenaustauschchromatographie-Fertigsäulen. Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem. 9, 99-1o2 (1971)

14. Doss, M., Schmidt, A.:
Rapid determination of urinary total porphyrins by ion exchange chromatography.
Z. Klin.Chem. u. Klin. Biochem., 9, 415-418 (1971)

15. Doss, M., Schermuly, E., Koss, G.:
Hexachlorobenzene Porphyria in rats as a model for human chronic hepatic porphyrias.
Annals of Clinical Research 8, 171-181 (1976)

16. Elder, G.H., Evans, J.O., Matlin, S.A.:
The effect of the porphyrogenic compound, hexachlorobenzene, on the activity of hepatic uroporphyrinogen decarboxylase in the rat.
Clinical Science and Molecular Medicine, 51, 71-8o (1976)

17. Goldstein, J.A., Friesen, M., Linder, R.E., Hickman, P., Hass, I.R., Bergman, H.:
Effects of pentachlorophenol on hepatic drug-metabolizing enzymes and porphyria related to contamination with chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans.
Biochemical Pharmacology, 26, 1549-1557 (1977)

18. Grisler, R., Griffini, A., Colombo, R., Colombo, G.:
Determinazione delle porfirine orinarie: Confronto tra il metodo rapido cromatografico-spettrofotometrico e il fluorimetrico a doppia estrazione. Il Patologo Clinico, Juli 1972

19. Jacobson, I., Yllner, S.:
Metabolism of ^{14}C-pentachlorophenol in the mouse.
Acta pharmacol (Kbh.) 29, 513-524 (1971)

2o. Kalberer, F., Rutschmann, I.:
Eine Schnellmethode zur Bestimmung von Tritium, Radiokohlenstoff und Radioschwefel in beliebigem organischem Probenmaterial mittels des Flüssigkeits-Scintillations-Zählers.
Helv. chim. Acta 44, 1956-1966 (1961)

21. Koss, G., Koransky, W., Steinbach, K.:
Studies on the toxicology of hexachlorobenzene
II. Identification and determination of Metaboli-
tes. Arch. Toxicol. 35, 1o7-114 (1976)

22. Koss, G., Seubert, S., Seubert, A., Koransky, W.,
Ippen, H.:
Studies on the toxicology of hexachlorobenzene
III. Observations in a long-term experiment.
Angenommen zur Publikation in: Arch. Toxicol.
(1978)

23. Larsen, R.V., Kirsch, L., Shaw, S.M., Christian, S.E.,
Born, G.S.:
Excretion and tissue distribution of uniformly
labelled ^{14}C-pentachlorophenol in rats.
J. pharm. Sci. 61, 2oo4-2oo6 (1972)

24. Patterson, M.S., Greene, A.C.:
Measurement of low energy beta-emitters in
aqueous solution by liquid scintillation counting
emulsions.
Anal. Chem. 37, 854-857 (1965)

25. Petroff, C.P., Patt, H.H., Nair, P.P.:
A rapid method for dissolving tissue for liquid
scintillation counting.
Int. J. appl. Radiat. 16, 599-6o1 (1965)

26. Rauen, H.M.:
Biochemisches Taschenbuch II, Springer-Verlag,
Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York (1964)

27. Residue Reviews, 1o, 11o (1965)

28. Ruge, I., Kaczmarczyk, N.:
Methoden der Löschkorrektur beim Flüssigkeits-
Szintillations-Zählen. Kerntechnik, Isotopen-
technik und -Chemie 9, 399-4o6 (1967)

29. Seubert, S., Seubert, A.:
Bestimmung der Erythrozyten-Porphyrine.
Vergleich zweier Methoden.
Dtsch.med.Wschr. 1o2, 1882-1884 (1977)

3o. Sinclair. P.R., Granick, S.:
Uroporphyrin Formation induced by chlorinated
hydrocarbons (Lindane, polychlorinated Biphenyls,
Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin). Requirements for
endogenous iron, protein synthesis and drug-
metabolizing activity.
Biochemical and Biophysical Research Communica-
tions, 61, 124-133 (1974)

31. Tschudy, D.P., Bonkowsky, H.L.:
Experimental porphyria. Federation Proceedings
31, 147-159 (1972)

32. Weinbach, E.C., Garbus, J.:
The interaction of uncoupling Phenols with Mitochondria and with mitochondrial Protein.
The Journal of Biological Chemistry 240, 1811-1819 (1965)

Am Ende dieser Arbeit ist es mir ein aufrichtiges Bedürfnis, sowohl Herrn Professor Dr. Koransky, der mir die Möglichkeit gab, in seinem Institut und unter seiner Anleitung die dargestellten Untersuchungen durchzuführen, wie auch Herrn Dr. Koss, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und dessen Hilfe wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat, zu danken.

Große Hilfsbereitschaft durfte ich auch durch Frau Seidel und alle Mitarbeiter des Institutes erfahren.

Mein Dank gilt auch Herrn und Frau Drs. Seubert aus der Hautklinik der Universität Göttingen (Dir.: Prof. Dr. med. H. Ippen) für ihre Bereitwilligkeit, die bei der Auftrennung der im Urin nachgewiesenen Porphyrine und die bei der Bestimmung der Leberporphyrine ermittelten Ergebnisse zu überprüfen.

LEBENSLAUF

23.8.1944	geboren in Schleching als zweites Kind des Konditormeisters Alois Straub (gefallen am 3.4.1945) und seiner Ehefrau Agnes, geborene Graßl
1951-1954	Besuch der Volksschule in Schleching
1955-196o	Besuch der Oberrealschule in Marquartstein. Beendigung des Schulbesuches wegen des Todes meiner Mutter. Abschluß: Mittlere Reife
196o-1961	Besuch der Hotelfachschule in Bad Reichenhall
1961-1964	Führung des elterlichen Hotels, zusammen mit dem Bruder
1964-1965	Volontärzeit im Hotel "Bayerischer Hof" in Freising
1965-1967	Besuch der Diätfachschule in München Abschluß: Diplom mit staatlicher Anerkennung
1967-197o	Tätigkeit als Diätassistentin auf der III. Medizinischen Abteilung des Krankenhauses Schwabing in München. Klinische Untersuchungen und Publikationen auf dem Gebiet der Diätetik und Ernährungslehre unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. H. Mehnert
197o-1972	Vorbereitung auf das Begabtenabitur und Erlangung der allgemeinen Hochschulreife
Sommer 1972	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
Winter 1972/1973	Vorphysikum
Winter 1973/1974	Physikum
April 1974	Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes
Winter 1974/1975	1. Teil der ärztlichen Prüfung
April 1976	Studienplatzwechsel an die Philipps-Universität in Marburg
	Beginn der vorliegenden Dissertation am In-

	stitut für Toxikologie und Pharmakologie der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Herrn Professor Dr. med. W. Koransky
April 1977	Studienplatzwechsel an die Medizinische Hochschule in Lübeck
Sommer	2. Teil der ärztlichen Prüfung
Oktober 1977 - Oktober 1978	Praktisches Jahr: 4 Monate Innere Medizin 4 Monate Ophthalmologie 4 Monate Chirurgie
Oktober 1978	3. Teil der ärztlichen Prüfung

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

in München:
Bachmann, Braun-Falco, Buchborn, Bücher, Eder, Eyer, Frick, Goerke, Hug, Jahrmärker, Karl, Kiese, Kramer, Lissner, Lund, Marghescu, Meister, Murken, Naumann, Riecker, Scholz, ten Bruggencate, Thorn, Thurau, Witt, Zander, Zöllner.

in Marburg:
Buchholz, Hamelmann, Klaus, Koransky, Martini, Oepen, Rodeck, Solcher, Willenbockel.

in Lübeck:
Piper, Otto, Ritter, Schildberg.